12-11

SYBR® Green Realtime PCR Master Mix

(Code No. QPK-201, QPK-201X5)

取扱説明書

TOYOBO CO., LTD. Life Science Department
OSAKA JAPAN

A3314K

【 目　次 】

【 ご注意 】

本製品は研究用試薬です。診断・臨床用試薬として決して使用しないでください。本製品の使用にあたっては、実験室での一般の注意事項を厳守し、安全に留意してください。

［１］はじめに

１．本品の概要

本製品は、プライマーとサンプルDNA以外の全ての組成を含む2×マスターミックスです。既にSYBR® Green I(Molecular Probes Inc.)を含有しているので、未標識のプライマーを用いてインターカレーターアッセイ法によるリアルタイム定量PCRを実施できます。

２．本品の特長

・高い汎用性

本製品は、ロシュ・ダイアグノスティックス社のLightCycler™など、ガラスキャピラリーを使用するシステムに対応するため、BSAを含有しています。一方、アプライドバイオシステムズ社のABI PRISM®7700などに対応したパッシブリファレンス色素も添加しています。このパッシブリファレンス色素は、これを利用しないその他のシステムでの使用に影響がないことを確認しております。

・高速なホットスタートが可能

本製品は、非特異反応を抑えるため、抗Taqモノクローナル抗体を使用したホットスタートPCRを採用しており、極めて速やかな再活性化が可能です。従来は、ポリメラーゼの再活性化のために10分以上を要していた最初の変性工程が1分以内で完了、各サイクルの変性ステップも核酸の変性に必要な時間だけを考慮して設定いただけます。LightCycler™など高速なPCR装置では、その時間短縮メリットをよりいっそう生かすことができます。

［２］本品に含まれるもの

本製品には以下のパーツが含まれています。

品名および内容	保存	QPK-201 (50μL 反応 x 200 回用)	QPK-201X5 (50μL 反応 x 1000 回用)
SYBR® Green Realtime PCR Master Mix	-20°C (または 4°C で 2 ヶ月以内) 遮光保存	1mL x 5 本	(1mL x 5 本) x 5

[SYBR® Green Realtime PCR Master Mix]

dNTP、$MgCl_2$、Taq DNAポリメラーゼや抗Taqモノクローナル抗体などのPCR反応組成およびSYBR® Green Iを含む溶液です。濃度は反応時組成の2倍になっています。サンプルDNA、プライマーを添加し、蒸留水で1倍濃度に調製してご使用ください。なるべく凍結融解を避け-20℃以下で遮光して凍結保存してください。また、融解後は緩やかに転倒混和して均質化してください。当社内の検討では、10回凍結融解を繰り返しても、特に品質上の劣化が認められませんでした。それ以上に凍結融解を行う可能性がある場合は、最初の融解時に小分注し、遮光して凍結保存してください。また、融解後2ヶ月程度は4℃でも安定です。この場合も遮光する必要がありますので、遮光できる箱か、添付のアルミ袋で保存してください(QPK-201には、包装以外にもう1枚アルミ袋を添付しておりますので、-20℃と4℃でお使い分けください)。

［３］ ご用意いただくもの

１． 本品の他に必要な試薬・機材

[プライマー]

検出・定量したい遺伝子配列に対応したプライマーペアをご用意ください。より精度の高い測定を行うためには、PCRのサイクル条件やプライマー濃度など条件検討を実施した上で、最適のプライマーと反応条件を選択されることをお薦めします。

以下に、プライマー設計時の一般的な注意事項を挙げます。インターカレーターアッセイでは、プライマーダイマーなどの非特異的な増幅産物も検出されてしまい、増幅曲線上は区別できません。高感度で定量性のあるデータを得るためには、プライマーの設計が最も重要です。

- プライマーは未標識のものを使用し、長さは20-30mer、GC含量は40-60%、プライマーダイマーなどの発生が少ないように設定します。
- 増幅領域の長さは200bp以下、できれば150bp以下に設定します。長すぎると増幅効率が低下し、また非特異反応も起こりやすくなるため、検出感度が低下します。新規に設計される場合は、50～150bpを目安にしてください。

[蒸留水]

一般のPCRなどに使用可能な純度の水をご使用ください。

[リアルタイムPCR装置]

アプライドバイオシステムズ社のABI PRISM®7700、ロシュ・ダイアグノスティックス社のLightCycler™、バイオフラックス社のLineGeneなどの各種リアルタイムPCR装置がご使用いただけます。ご使用にあたっては各装置の取扱説明書に従ってください。

２． サンプルDNA

[cDNA]

・1st strand cDNA合成反応液をご使用ください。cDNA合成時のプライマーは、ランダムプライマー、オリゴdTプライマーのどちらも使用可能です。必要に応じてフェノール処理・エタノール沈殿などで精製してご使用ください。
・当社のリアルタイムPCR用cDNA合成キット「ReverTra Ace® qPCR RT Kit」(Code:FSQ-101)であれば、反応液の原液を20%まで持ち込むことができます。
・また、当社の1st strand cDNA合成キット「ReverTra Ace -α-®」(Code:FSK-101)の反応液であれば、10倍以上に希釈してご使用いただけます。原液でも増幅は致しますが、cDNA合成時のプライマーや(熱処理しても)逆転写酵素の混入がPCRの定量性に影響する場合があります。希釈してご使用することをお薦めします。

[ゲノムDNAなど]

通常のPCRに使用可能な精製度のDNAサンプルをご使用ください。ヒトのゲノムDNAなどでは、1～10ng程度が適当です。大量のゲノムDNAなどを加えると、それ自体に由来するシグナルが検出され、ベースラインが上がることがあります。

［４］プロトコール

１．ABI PRISM®7700を用いたインターカレーターアッセイ

(1)反応液の調製

[PCR反応液(例)](プライマー 0.4μM、反応スケール 50μL)

蒸留水	16 μL
SYBR® Green Realtime PCR Master Mix	25 μL
プライマー 1 (10μM)	2 μL
プライマー 2 (10μM)	2 μL
サンプル溶液	5 μL
合計液量	50 μL

・SYBR® Green Realtime PCR Master Mix は合計液量の1/2としてください。これ以外の組成は最適な条件にご変更いただいて結構です。また、合計液量(反応スケール)を変更する場合は、最適条件の比率を維持してください。
・プライマーは最終0.2～0.6μMを中心にご検討ください。増幅効率がよくない場合、増量することにより向上する場合があります。ただし、過剰量の添加は非特異反応の原因となる場合もあります。
・実際の調製では、必要本数分＋αについて、サンプル溶液以外を含むプレミックス溶液を調製し、所定量をチューブに分注後、最後に、各々のチューブに、サンプル溶液を添加してください。

(2)PCRの実施

・以下のサイクルは一例です。まずは、3ステップサイクルでお試しください(例1)。アニール温度は、プライマーのTmなどにより、55℃～65℃程度を中心に調節してください。プライマーによっては、その範囲外に最適値がある場合もあります。
・本品はポリメラーゼの再活性化が極めて短時間で完了しますので、最初の変性時間は60秒、各サイクルの変性時間も15秒で十分です。必要以上の加熱は、酵素活性を低下させて結果に影響を及ぼす可能性がありますので、特に5分以上の初期変性は避けてください。
・Detectorは「SYBR」、Quencherは「None」で実施します。詳細は装置の取扱説明書をご参照ください。
・data collectionのステップは30秒以上確保してください。
・2ステップサイクルも可能です(例2)。この場合、data collectionはアニール・伸長ステップに設定してください。

２． Roche LightCycler™を用いたインターカレーターアッセイ

(1)反応液の調製

[PCR反応液(例)](プライマー 0.4μM、反応スケール 20μL)

蒸留水	6.4	μL
SYBR® Green Realtime PCR Master Mix	10	μL
プライマー 1 (10μM)	0.8	μL
プライマー 2 (10μM)	0.8	μL
サンプル溶液	2	μL
合計液量	20	μL

・SYBR® Green Realtime PCR Master Mix は合計液量の1/2としてください。これ以外の組成は最適な条件にご変更いただいて結構です。また、合計液量(反応スケール)を変更する場合は、最適条件の比率を維持してください。

・プライマーは最終0.2～0.6μMを中心にご検討ください。増幅効率がよくない場合、増量することにより向上する場合があります。ただし、過剰量の添加は非特異反応の原因となる場合もあります。

・実際の調製では、必要本数分＋αについて、サンプル溶液以外を含むプレミックス溶液を調製し、所定量をキャピラリーに分注後、最後に、各々のキャピラリーに、サンプル溶液を添加してください。

(2)PCRの実施

・以下のサイクルは一例です。アニール温度は、プライマーのTmなどにより、55℃～65℃程度を中心に調節してください。プライマーによっては、その範囲外に最適値がある場合もあります。まずは、アニール温度55℃、アニール時間10秒でお試しください。増幅が悪い場合、20秒程度まで延長してください。また、プライマーダイマーの発生など、非特異反応の発生が見られる場合は、5秒程度まで短縮してください。

・本品はポリメラーゼの再活性化が極めて短時間で完了しますので、最初の変性時間は30秒、各サイクルの変性時間も5秒設定で十分です。必要以上の加熱は、酵素活性を低下させて結果に影響を及ぼす可能性がありますので、特に5分以上の初期変性は避けてください。

・伸長時間は、増幅領域が200bp以内であれば通常は15秒で十分ですが、鎖長に応じて調節してください。data collectionのステップは10秒以上確保する必要があります。

・DetectorはF1で実施してください。また、通常はTemperature Transition Rateはすべて20℃/sec(最大)で問題ありません。詳細は装置の取扱説明書をご参照ください。

・2ステップサイクルも可能です。この場合、data collectionはアニール・伸長ステップに設定してください。

[PCRサイクル(例)](3ステップ、アニール 55℃／伸長 72℃)

95℃　30秒
↓
95℃　 5秒 ┐
55℃　10秒 │ ×40サイクル
72℃　15秒(data collection) ┘
↓
融解曲線(Melting Curve)解析

３．BioFlux LineGeneを用いたインターカレーターアッセイ

(1)反応液の調製

[PCR反応液(例)](プライマー 0.4μM、反応スケール 10μL)

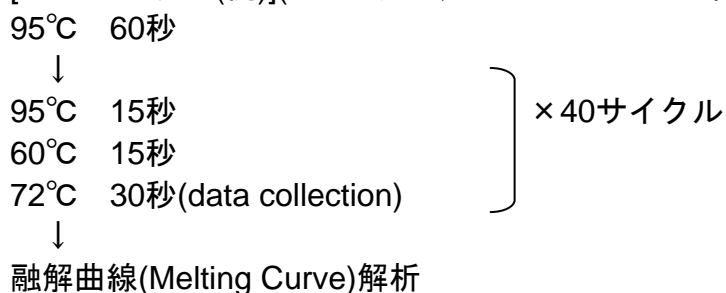
蒸留水	2.2	μL
SYBR® Green Realtime PCR Master Mix	5	μL
プライマー 1 (10μM)	0.4	μL
プライマー 2 (10μM)	0.4	μL
サンプル溶液	2	μL
合計液量	10	μL

・SYBR® Green Realtime PCR Master Mix は合計液量の1/2としてください。これ以外の組成は最適な条件にご変更いただいて結構です。また、合計液量(反応スケール)を変更する場合は、最適条件の比率を維持してください。
・プライマーは最終0.2～0.6μMを中心にご検討ください。増幅効率がよくない場合、増量することにより向上する場合があります。ただし、過剰量の添加は非特異反応の原因となる場合もあります。
・実際の調製では、必要本数分＋αについて、サンプル溶液以外を含むプレミックス溶液を調製し、所定量をチューブに分注後、最後に、各々のチューブに、サンプル溶液を添加してください。

(2)PCRの実施

・以下のサイクルは一例です。まずは、3ステップサイクルでお試しください。アニール温度は、プライマーのTmなどにより、55℃～65℃程度を中心に調節してください。プライマーによっては、その範囲外に最適値がある場合もあります。
・本品はポリメラーゼの再活性化が極めて短時間で完了しますので、最初の変性時間は60秒、各サイクルの変性時間も15秒設定で十分です。必要以上の加熱は、酵素活性を低下させて結果に影響を及ぼす可能性がありますので、特に5分以上の初期変性は避けてください。
・蛍光検出チャンネルは、Channel F1を使用します。
・2ステップサイクルも可能です。この場合、data collectionはアニール・伸長ステップに設定してください。

[PCRサイクル(例)](3ステップ、アニール 60℃／伸長 72℃)

95℃　60秒
↓
95℃　15秒 ⎫
60℃　15秒 ⎬ ×40サイクル
72℃　30秒(data collection) ⎭
↓
融解曲線(Melting Curve)解析

４． 逆転写酵素添加による1ステップ RT-PCR

(1)概要

・本試薬は、cDNAやゲノムDNAなどDNAサンプルをターゲットとしたPCR試薬ですが、逆転写酵素を加えることにより、RNAサンプルで1ステップ RT-PCRを実施することができます。しかし、1ステップ RT-PCRは、通常のPCRよりも非特異反応が発生しやすいですので、プライマーや条件によっては、インターカレーターアッセイが実施できない場合があることをご理解の上、ご検討ください。
・本プロトコールは、当社の逆転写酵素「ReverTra Ace®」(Code:TRT-101)を用いた場合です。他社製逆転写酵素では最適条件が異なる場合があります。

(2)反応液の調製

・通常のPCR反応液組成に、「RNase Inhibitor」(Code:SIN-201) 0.5U/μL、ReverTra Ace® 0.01～0.3U/μL(いずれも最終濃度)を添加します。その他の組成に変更はありません。また、プライマーダイマーの発生が見られる場合には、ReverTra Ace®の濃度を下げて、お試しください。
・ReverTra Ace®はそのままでは使いにくいので、希釈してご使用されることをお薦めします。RNase Inhibitorを蒸留水にて5U/μLに希釈し、これを希釈用液とします。これを用いてReverTra Ace®の希釈液(RT希釈液)を作製します。RT希釈液は用時調製とし、余ったRT希釈液は廃棄してください。
・ゲノムDNAの混入など、DNAからの増幅をチェックする目的で、RT(-)コントロール(逆転写酵素を含まない反応液)をとられることをお薦めします。

[RT希釈液(例)](ReverTra Ace® 3U/μL (最終0.3U/μL))

RT希釈用液 (RNase Inhibitor 5U/μL)	32 μL
ReverTra Ace® (100U/μL)	1 μL
合計液量	33 μL

[PCR反応液(例)](プライマー 0.4μM、反応スケール 50μL)

蒸留水	11 μL
SYBR® Green Realtime PCR Master Mix	25 μL
プライマー 1 (10μM)	2 μL
プライマー 2 (10μM)	2 μL
RT希釈液 (ReverTra Ace® 3U/μL)	5 μL
サンプル溶液	5 μL
合計液量	50 μL

・SYBR® Green Realtime PCR Master Mix は合計液量の1/2としてください。これ以外の組成は最適な条件にご変更いただいて結構です。また、合計液量(反応スケール)を変更する場合は、最適条件の比率を維持してください。LightCycler™の標準液量は20μL、LineGeneの標準液量は10μLです。
・プライマーは最終0.2～0.6μMを中心にご検討ください。増幅効率がよくない場合、増量することにより向上する場合があります。ただし、過剰量の添加は非特異反応の原因となる場合もあります。

・実際の調製では、必要本数分＋αについて、サンプル溶液以外を含むプレミックス溶液を調製し、所定量をチューブに分注後、サンプル溶液を添加してください。

(3)PCRの実施

・基本的に、通常のPCRサイクル(プロトコール１、２および３を参照)の最初に42℃ 20分程度の逆転写反応工程を付与し、最初の変性工程を5分程度に延長すること(逆転写酵素を完全に失活させ、PCR阻害を防ぐ)が必要です。その後は、プロトコール１、２および３を参照して、通常のサイクルを実施してください。
・以下のサイクルは一例です。アニール温度は、プライマーのTmなどにより、55℃～65℃程度を中心に調節してください。プライマーによっては、その範囲外に最適値がある場合もあります。

［５］ トラブルシューティング

１． 増幅曲線がみられない、乱れる

(1) 装置の設定に関する問題(各装置の取扱説明書参照)

原因	対策
ディテクターの設定などがSYBR® Green Iに適合していない	ディテクターの設定を適正化して再解析してください。
データコレクトの設定が不適切	設定を適正化して再実験してください。
サンプル位置の設定ミス	適正なサンプル位置を設定して再解析、あるいは再実験してください。
その他装置の故障・不具合	各装置の取扱説明書に従い､点検してください。

(2) 試薬に関する問題

原因	対策
PCR反応条件･プライマーの濃度･配列などが不適切	プライマー濃度やPCR反応条件の変更をご検討ください。増幅が悪い場合は、一般的にアニール温度を下げる、アニール時間を長くするか、プライマー濃度を上げてみます。まれに、逆にアニール温度を上げることや､伸長時間の延長などで向上することもあります。また、GC含量の高いターゲットでは､変性時間を延長することで、改善することもあります。それでも良い結果が得られない場合は､プライマー再設計をお薦めします。
サンプルの純度が低い	フェノール抽出やエタノール沈殿で精製して再実験してください。cDNAの場合、逆転写酵素の残留が影響する場合があります。

２． 定量値がばらつく

(1) 装置の設定に関する問題(各装置の取扱説明書参照)

原因	対策
装置の故障・不具合	装置の不具合により､温度管理や検出にばらつきが生じている場合があります｡各装置の取扱説明書に従い、点検してください。

(2) 試薬に関する問題

原因	対策
サンプルの純度が低い	フェノール抽出やエタノール沈殿で精製して再実験してください。cDNAの場合、逆転写酵素の残留が影響する場合があります。

原因	対策
PCR反応条件・プライマーの濃度・配列などが不適切	増幅効率の悪いPCR系は、ばらつきが大きい傾向があります。プライマー濃度やPCR反応条件の変更をご検討ください。増幅が悪い場合は、一般的にアニール温度を下げる、アニール時間を長くするか、プライマー濃度を上げてみます。伸長時間の延長などでも向上することがあります。また、GC含量の高いターゲットでは、変性時間を長くすることで、改善することがあります。それでも、ばらつきが大きい場合は、プライマー再設計をお薦めします。
分注量のばらつき	所定よりも小さい反応スケールで実施している場合、分注誤差が大きくなることがあります。反応スケールを上げて再実験してください。

３．ブランクサンプルにシグナルがみられる

融解曲線分析を実施した上で、ご判断ください。

(1) 融解曲線のピークが陽性サンプルと同じ温度である

原因	対策
陽性サンプルやPCR産物のコンタミネーション	まずは、ブランクに用いたサンプル(水)を新しいものに交換してください。それでも改善が見られない場合は、使用するプライマーや試薬などを新しいものに交換して再検討してください。

(2) 融解曲線のピークが陽性サンプルと異なる(低い)

原因	対策
プライマーダイマーなど非特異反応の発生	プライマー濃度やPCR反応条件の変更をご検討ください。非特異反応が出る場合は、アニール温度を上げる、アニール時間、伸長時間を短くするか、プライマー濃度を下げてみます。それでも発生する場合は、プライマー再設計をお薦めします。

［６］関連商品

品名	内容	Code No.
ReverTra Ace®を使用したcDNA合成キット **ReverTra Ace -α-®**	100回用	FSK-101
リアルタイムPCR用cDNA合成キット **ReverTra Ace® qPCR RT Kit**	200回用	FSQ-101
リアルタイムPCR用cDNA合成マスターミックス **ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix**	200回用	FSQ-201
ゲノムDNA除去試薬をプラスしたリアルタイムPCR用cDNA合成試薬 **ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover**	200回用	FSQ-301
高伸長性・高反応効率の改良型逆転写酵素 **ReverTra Ace®**	10,000U×1本 (10,000U×1本)×5 (10,000U×1本)×10	TRT-101 TRT-101X5 TRT-101X10
ゲノムDNAの混入を抑えた組換型RNase阻害剤 **RNase Inhibitor, recombinant**	2,500U×1本 (2,500U×1本)×5	SIN-201 SIN-201X5
リアルタイムPCR用マスターミックス(プローブアッセイ用) **Realtime PCR Master Mix**	1mL×5本 (1mL×5本)×5	QPK-101 QPK-101X5
信頼性をさらに向上させたリアルタイムPCR用マスターミックス(SYBR® Greenアッセイ用) **SYBR® Green Realtime PCR Master Mix -Plus-**	1mL×5本 (1mL×5本)×5	QPK-212 QPK-212X5
各種蛍光プローブ・蛍光プライマー検出系用リアルタイムPCR試薬 **THUNDERBIRD® Probe qPCR Mix**	1mL×1本 1.67mL×3本 (1.67mL×3本)×5	QPS-101T QPS-101 QPS-101X5
SYBR® Green I検出系用リアルタイムPCR試薬 **THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix**	1mL×1本 1.67mL×3本 (1.67mL×3本)×5	QPS-201T QPS-201 QPS-201X5
1-step リアルタイムPCR用マスターミックス(プローブアッセイ用) ***RNA-direct*™ Realtime PCR Master Mix**	500μL×5本 (500μL×5本)×5	QRT-101 QRT-101X5
1-step リアルタイムPCR用マスターミックス(SYBR® Greenアッセイ用) ***RNA-direct*™ SYBR® Green Realtime PCR Master Mix**	500μL×5本 (500μL×5本)×5	QRT-201 QRT-201X5

【製造・販売元】

－納期・注文に関するお問い合わせ－

東洋紡株式会社　ライフサイエンス事業部　(大阪)
〒530-8230　大阪市北区堂島浜二丁目 2 番 8 号
TEL 06-6348-3786　FAX 06-6348-3833
E-mail : order_lifescience@toyobo.jp

東洋紡株式会社　ライフサイエンス事業部　(東京)
〒141-8633　東京都品川区東五反田二丁目 10 番 2 号　東五反田スクエア
TEL 03-6422-4819　FAX 03-6422-4951
E-mail : order_lifescience@toyobo.jp

－製品の内容・技術に関するお問い合わせ－

テクニカルライン
TEL 06-6348-3888　FAX 06-6348-3833
開設時間　9:00～12:00 , 13:00～17:00　(土、日、祝を除く)
E-mail : tech_osaka@toyobo.jp
［URL］http://www.toyobo.co.jp/bio